

# Foszfatázaktivitás meghatározás nemzetközi körtesztjének értékelése

*Zsarnóczy Gabriella*

Országos Húsipari Kutatóintézet Kft., Budapest

Érkezett: 1997. augusztus 25.

A sertéshús készítmények hőkezelési előírása (USDA—FSIS, 1982) szerint legalább 69 °C maghőmérsékletet kell elérni a termék geometriai középpontjában egyes patogén vírusok (száj- és körömfájás stb.) inaktiváláshoz. Ennek ellenőrzésére a hőkezelés utáni maradék savanyú foszfátáz enzim meghatározását ajánlottuk (Körmendy és mtsai., 1992). A savanyú foszfátáz megtalálható többek között a májban (Igarashi és Hollander, 1968), a prosztatában és placentában (Di Pietro és Zengerle, 1967), a vérszérumban (Roche Diagnostica, 1986), a tejben (Griffiths, 1986), de az izomszövetben is. Ez utóbbinál a hús érése során bekövetkező ATP bomlás egyik részfolyamatában vesz részt (Lawrie, 1979).

A foszfátáz meghatározás alapja, hogy a húspanban lévő enzim hő hatására inaktiválódik. A főzés után visszamaradó reziduális aktivitás arányos a dinátrium-fenil-foszfáttól (szubsztrátum) felszabadított fenol mennyiségével. A keletkezett fenolt 2,6-dibróm-kinon-4-klórimiddel reagáltatva kék színű vegyület keletkezik, melynek mennyisége 610 nm hullámhossznál spektrofotometriásan mérhető. A húspanban lévő savanyú foszfátáz meghatározását eredetileg Körmendy (1963) dolgozta ki, majd több külföldi laboratórium is adaptálta (Cohen, 1969; Finogerova és mtsai., 1973; Tyszkiewicz és Krysiak, 1976), végül Lind (1984) munkája révén az eljárás ma már az USDA (United States Department of Agriculture) elfogadott módszerei közé tartozik (USDA, 1987). A Lind-féle módszerrel kapcsolatban azonban problémák merültek fel: szűk mérési tartomány, nagy szórás, illetve gyenge reprodukálhatóság. Ezek kiküszöbölésére a mérés paramétereinek optimalizálásával, Körmendy és munkatársai (1992) a módszert módosították. Ezáltal a módszer érzékenysége mintegy háromszorosára nőtt (Zsarnóczy és Körmendy, 1992).

E módosított eljárás megbízhatóságát (ismételhetőség és összehasonlíthatóság) nemzetközi körteszttel ellenőriztük. A körtesztben az Országos Húsipari Kutatóintézetten kívül 6 magyar intézmény vett részt: a Szekszárdi Húsipari Rt., a Fővárosi Állat-és Élelmiszer-ellenőrző Állomás, az Élelmiszer-és Élelmiszer-ellenőrző Szolgálat, a Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszéke, a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Hűtőtechnológiai és Állati Termék Tanszéke, valamint Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszéke. A külföldi résztvevők a következők voltak: a Milanói Tudományegyetem

Állati Termékek Minőségellenőrző Intézete, a Pármai és Veronai Tudományegyetem Áruismereti Tanszéke, valamint a Hannoveri Állatorvosi Főiskola Élelmiszer-Áruismereti, Húshigiéniái és Hústechnológia Tanszéke.

A körteszt indulása előtt a résztvevő laboratóriumok lehetőséget kaptak a módszer begyakorlására és a problémák megvitatására. A külföldi laboratóriumok munkatársaival sajnos nem tudtunk személyesen találkozni, a felmerült kérdéseket levelezés útján tisztáztunk. A módszerről egy video felvétel is készült, melyet minden résztvevő laboratóriumnak megküldtünk.

## Anyag és módszer

### Vizsgálati anyag

Öt különböző foszfatázaktivitású vizsgálati anyagot („sonka mintát”) készítettünk 2 „rejtett” párhuzamossal, tehát összesen 5x2 mintát. A „rejtett” párhuzamosokról a résztvevő laboratóriumoknak természetesen nem volt tudomásuk, a minták jelölésére szolgáló randomizált számkódokból ugyanis azok eredetére nézve semmilyen következtetést nem lehetett levonni. A résztvevő laboratóriumoknak egymásról nem volt tudomásuk.

#### *A vizsgálati anyag összetétele:*

sovány, post rigor sertéscomb	90,0 %
nitrites sókeverék (99,5 % NaCl + 0,5 % NaNO <sub>2</sub> )	3,0 %
Na-trifoszfát (Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	0,5 %
víz	6,5 %

#### *A vizsgálati anyag kémiai összetétele:*

fehérjetartalom	20,0 %
zsírtartalom	1,0 %
víz tartalom	72,9 %

A minta készítésénél a húst 2 mm-es tárcsán ledaráltuk, majd hozzáadtuk a vízben feloldott nitrites sókeveréket és trifoszfátot. A masszát élelmiszeraprító berendezésen (Multiboy LZ 251) homogenizáltuk és polietilén-poliamid zacskóba helyeztük. A massa vastagsága a zacskóban 2 mm-nél kisebb volt, ebben az esetben ugyanis a teljes keresztmetszet átmelegedési ideje 20 másodpercnél kisebb, ami a teljes hőkezelés időtartamához képest elhanyagolható. A zacskókat vákuumhegesztés után vízfürdőben 70 °C-on, különböző időtartamig főztük. A minták jelölése a következő volt:

A minta:	70 °C-on,	7 perc,
B minta:	70 °C-on,	20 perc,
C minta:	70 °C-on,	80 perc,
D minta:	70 °C-on,	100 perc,
E minta:	70 °C-on,	200 perc.
A kezelések száma tehát		5.

Hőkezelés után a mintákat vízcsap alatt azonnal lehűtöttük, és tartalmukat 2 mm-es tárcsán történő ledarálás után 3 % toluollal alaposan összekevertük. Ez utóbbi célja a mikrobás tevékenység gátlása volt. Előkísérletek alapján ugyanis megállapítottuk, hogy a toluollal tartósított, és 13 °C-nál nem nagyobb hőmérsékleten tárolt minták foszfatázaktivitásában 14 nap alatt nem következik be észrevehető változás. Az alaposan összekevert toluolos húsmintát ezután 30 g-os adagokban polietilén-poliamid zacskókba csomagoltuk, azokat vákuumban lezártuk, és a véletlen számtáblázat alapján kódszámokkal (MSZ 546/1977) láttuk el. Az ily módon elkészített csomagokat külföldre gyorsposta szolgálattal, belföldre pedig hűtőtáskában gépkocsival szállítottuk. Az első körtesztet 1993 októberében, a másodikat 1994 áprilisában végeztük azért, hogy a környezeti hőmérséklet a szállítás alatt viszonylag alacsony legyen. A mintákat a laboratóriumoknak a vizsgálat elvégzéséig hűtőszekrényben kellett tárolniuk, és a vizsgálatokat a minták elkészítésétől számított 14 napon belül el kellett végezniük, minden mintából 2 párhuzamos mérésével.

### **Mérési módszer**

A módosított foszfatáz meghatározási módszer a következő.

#### *Szükséges felszerelések*

Húsdaráló, 2 mm lyukátmérőjű tárcsával; analitikai mérleg; Ultra Turrax homogenizáló (TP 18/12 Janke und Kunkel K.G.); mágneses keverő; 10 és 20 cm<sup>3</sup>-es csiszolt dugós kémcsövek; 100 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer-lombik; pipetták; vízfürdő hőmérséklet szabályozóval; stopperóra; szűrőpapír (MN 615 1/4); spektrofotométer, pH-mérő.

#### *Szükséges oldatok*

- 0,05 mol/dm<sup>3</sup> citrátbuffer (pH=5,40): 8,036 g citromsav•H<sub>2</sub>O + 3,530 g NaOH desztillált vízzel 1 dm<sup>3</sup>-re feltöltve + 1 cm<sup>3</sup> toluollal összerázva (tartósítás céljából). Az oldatot hűtőszekrényben kell tárolni.
- 0,15 mol/dm<sup>3</sup> citrátbuffer (pH=5,00): 30,240 g citromsav•H<sub>2</sub>O + 11,760 g NaOH desztillált vízzel 1 dm<sup>3</sup>-re feltöltve + 1 cm<sup>3</sup> toluollal összerázva (tartósítás céljából). Az oldatot hűtőszekrényben kell tárolni.
- 0,05 mol/dm<sup>3</sup> dinátrium-fenil-foszfát oldat: 1,2704 g dinátrium-fenil-foszfátot 100 cm<sup>3</sup>-re töltünk 5,00 pH-jú 0,15 mol/dm<sup>3</sup> citrátbufferrel. Felhasználás előtt kell készíteni.
- 20 %-os triklór-ecetsav oldat: 20 g/100 cm<sup>3</sup>
- 5 %-os triklór-ecetsav oldat: 5 g/100 cm<sup>3</sup>
- 0,5 mol/dm<sup>3</sup> nátrium-karbonát oldat: 53 g vízmentes Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> desztillált vízzel 1 dm<sup>3</sup>-re feltöltve

- 0,4 %-os 2,6-dibróm-kinon-4-klórimid oldat: 0,02 g 2,6-dibróm-kinon-4-klórimid + 5 cm<sup>3</sup> absz. etanol. Naponta frissen kell készíteni és felhasználásig hűtőben kell tárolni.

### *A mérés menete*

- A homogenizált vizsgálati anyagból mérjük be 2,5 g-ot 100 cm<sup>3</sup>-es Erlenmeyer-lombikba és adjunk hozzá 50 cm<sup>3</sup> hideg (kb. 5—7 °C-os) 5,40 pH-jú 0,05 mol/dm<sup>3</sup> citrát-puffert. (Azért kell a puffernek hidegnek lennie, hogy a homogenizálásnál a hússzuspenzió felmelegedését elkerüljük.)
- A szuszpenziót Ultra Turrax készülékkel maximális fordulatszámon (20 000 ford/perc) 4-szer 10 másodpercig homogenizáljuk, 20 másodperces szünetekkel (ez utóbbi is a felmelegedés elkerülésére szolgál).
- 3-szor 10 cm<sup>3</sup> hússzuspenziót egyenletesen pipettázzunk (2 párhuzamos mérés és egy vak) – állandó keverés közben – 20 cm<sup>3</sup>-es csiszolt dugós kémcsövekbe. A szuszpenzió egyenletes eloszlását mágneses keverővel biztosítjuk. (Ez a lépés az eljárás egyik kritikus pontja, az enzimaktivitás ugyanis zömmel a koagulált fehérjét tartalmazó csapadékhoz kötött.)
- A vakpróbát az enzim inaktiválása céljából tegyük 30 percig 100 °C-os, forrásban lévő vízbe, majd vízzel hűtsük le szobahőmérsékletre.
- Mindhárom kémcsövet, valamint a frissen elkészített 0,05 mol/dm<sup>3</sup> dinátrium-fenil-foszfát oldatot helyezzük kb. 15 percig egy 37±0,5 °C hőmérsékletű vízfürdőbe.
- Adjunk hozzájuk 5 cm<sup>3</sup> 0,05 mol/dm<sup>3</sup> dinátrium-fenil-foszfát-oldatot és óvatosan rázzuk össze.
- A kémcsöveket 15 percenként – a szuszpenzió keveredése céljából – óvatosan fordítsuk meg.
- A dinátrium-fenil-foszfát-oldat hozzáadásától számított pontosan 1 óra elteltével adjunk hozzájuk 5 cm<sup>3</sup> 20 %-os triklór-ecetsav oldatot.
- Az oldatokat kb. 10 perces állás után szűrjük le.
- Valamennyi szűrletből pipettázzunk ki 5 cm<sup>3</sup>-t 10 cm<sup>3</sup>-es csiszolt dugós kémcsövekbe, majd adjunk hozzájuk 5 cm<sup>3</sup> 0,5 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-oldatot és rázzuk össze. Ezután adjunk hozzájuk 0,1 cm<sup>3</sup> 0,4 %-os 2,6-dibróm-kinon-4-klórimid oldatot, és az egészet azonnal óvatosan keverjük össze.

- Az oldatokat tartsuk 30 percig szobahőmérsékleten sötétben a maximális színkialakulás érdekében.
- Mérjük az oldatok abszorbanciáját 610 nm hullámhosszon 1 cm-es küvettában, desztillált vízzel szemben.

### *Az enzimaktivitás számítása*

Az 1 cm vastagságú küvettára vonatkoztatott abszorbancia értékét ( $a$ ) úgy kapjuk meg, hogy a két párhuzamos minta abszorbanciáját átlagoljuk ( $a_m$ ), majd levonjuk belőle a vakpróba abszorbanciáját ( $a_v$ ):

$$a = a_m - a_v$$

Amennyiben  $a_m < 0,2$ , a mérést 2 cm-es küvettában célszerű végezni,  $a_m > 0,9$  esetén pedig 0,5 cm-es küvettát célszerű használni. Ha  $a > 0,9$ , akkor a mérendő oldatot hígítani szükséges a következők szerint:

A szűrletből nem 5 cm<sup>3</sup>-t, hanem a várható fenoltartalomtól függően 1; 2; 3; 4 cm<sup>3</sup>-t pipettázunk ki, majd a térfogatot 5 %-os triklór-ecetsavval kiegészítjük 5 cm<sup>3</sup>-re. Ezután 5 cm<sup>3</sup> 0,5 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-oldatot, majd 0,1 cm<sup>3</sup> 0,4 %-os 2,6-dibróm-kinon-4-klórimid-oldatot adunk hozzá. A vakpróba szűrletéből is ugyanolyan mennyiséget kell kivenni, mint a vizsgált minta szűrletéből.

A foszfatázaktivitást a következő önkényes egységben adjuk meg: Egységnyi az a foszfatázaktivitás, ami az adott körülmények között 1000 g mintából 60 perc alatt 1 μmol fenol felszabadulását katalizálja:

$$PA = \frac{a \cdot 4}{0,476} \cdot \frac{1000}{f} \cdot 10$$

ahol: PA = foszfatázaktivitás [μmol fenol/1000 g minta]

a = abszorbancia (1 cm-es küvettára vonatkoztatva)

f = a fenol millimoláris abszorpciós indexe 610 nm-nél

(értéke a fenolkalibráció alapján ≈22 cm<sup>2</sup>/μmol)

### *Fenol kalibrációs görbéjének elkészítése*

A méréseket SPEKTROMOM 204 típusú fotométeren végeztük. A reakció során keletkezett fenol mennyiségének meghatározásához kalibrációs görbét vettünk fel a következőképpen:

- 1 g/dm<sup>3</sup> koncentrációjú fenol törzsoldatot készítettünk, melyből 5 cm<sup>3</sup>-t kipipettáztunk és hozzáadtunk 50 cm<sup>3</sup> 50 %-os triklór-ecetsavat, majd desztillált vízzel 500 cm<sup>3</sup>-re töltöttük fel. (Az így kapott fenololdat 5 % triklór-ecetsav tartalmú, fenolkoncentrációja pedig 10 μg/cm<sup>3</sup>.)

- 10 cm<sup>3</sup>-es csiszolt dugós kémcsőbe kipipettáztunk kétszer (2 párhuzamos mérés) 0; 1; 2; 3 és 4 cm<sup>3</sup> fenololdatot és a térfogatot 5 %-os triklór-ecetsavval 5 cm<sup>3</sup>-re egészítettük ki.
- Hozzáadtunk 5 cm<sup>3</sup> 0,5 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-oldatot, ami által az oldat pH-ja 9,5–9,6 közé esik, ahol az abszorbancia értéknek maximuma van.
- Az így kapott 10 cm<sup>3</sup> oldatban a fenolkoncentráció a következő volt: 0; 10; 20; 30 és 40 µg.
- Ezután 0,1 cm<sup>3</sup> 0,4 %-os 2,6-dibróm-kinon-4-klórimid-oldatot pipettáztunk a kémcsövekbe, és óvatosan azonnal összeráztuk.
- Az oldatokat 30 percig, a maximális színintenzitás kialakulásáig sötétben tartottuk.
- Az abszorbanciákat desztillált vízzel szemben, 1 cm-es küvettában, spektrofotométeren 610 nm hullámhosszon mértük.

A kapott eredmények alapján a fenol kalibrációs görbéből a millimoláris abszorpciós indexet kiszámítottuk.

## Eredmények és értékelés

A körteszt szervezésénél és értékelésénél az általános irányelveket vettük figyelembe (Youden és Steiner, 1975; ISO/DIS 5725, 1977; Amtl. Sammlung, 1983; Wernimont és Spendley, 1985; Körmendy és mtsai., 1988; Handbook of AOAC, 1989). A kiugró értékek kiszűrésére a Cochran próbát, valamint az egyoldali és kétoldali Grubbs próbát használtuk (Collaborative Study Guidelines, 1995). A laboratóriumon belüli **ismételhetőség** és a laboratóriumok közötti **összehasonlíthatóság** (reprodukálhatóság) standard eltéréseinek (SD<sub>r</sub> és SD<sub>R</sub>), illetve relatív standard eltéréseinek (RSD<sub>r</sub> és RDS<sub>R</sub>) számítását az előírásoknak megfelelően végeztük, ahol első lépésben varianciaanalízist alkalmaztunk. A kiugró értékek kiszűrése az előírásoknak megfelelően 2,5 %-os valószínűségi szinten történt (Collaborative Study Guidelines, 1995).

A nemzetközi körtesztben, mint említettük, 10 laboratórium vett részt. Az első vizsgálatsorozat értékeléséből egy laboratóriumot a metodikai előírások félreértése miatt kihagytunk. A különböző laboratóriumok által mért foszfátaktivitás értékeket az 1. táblázatban tüntettük fel.

A Cochran-féle maximum variancia próbával 4 kiugró értéket találtunk (p<0,025). A párhuzamosok átlagértékeivel végzett kétoldali Grubbs próba viszont 2 kiugró értéket mutatott. A kiugró értékek aránya, az A<sub>1</sub> minta kivételével, nem haladja meg a „IUPAC 1987 Harmonized Protocol” ajánlásait, ami a felső határt 2/9-nek szabja meg.

# 1. táblázat: Az első körtesztben mért foszfatázaktivitás értékek

Minta jele	A laboratóriumok által mért foszfatázaktivitások ( $\mu\text{mol fenol}/1000 \text{ g minta}$ )								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A <sub>1</sub>	1937	2187	2255	2300	1521**	2151*	2182	1363**	2120
	1956	2018	1936	2270	1373**	2770*	2178	1436**	2047
B <sub>1</sub>	1170	1282	1188	1470	1314*	1969*	1442	1099	1428
	1163	1211	1204	1491	602*	1504*	1447	1027	1411
C <sub>1</sub>	619	615	568	738	338	816	841	789	939
	614	571	628	614	270	852	721	763	802
D <sub>1</sub>	564	808	538	673	356	872	1061*	724	704
	545	884	553	699	391	918	732*	684	727
E <sub>1</sub>	382	276	415	465	583	621	424	530	575
	401	452	330	391	166	772	437	544	464

\* kiugró érték ( $p < 0,025$ ; Cochran próba)

\*\* kiugró érték ( $p < 0,025$ ; Grubbs próba)

A statisztikai értékelés eredményeit a kiugró értékekkel, illetve azok nélkül a 2. táblázat mutatja be. A táblázatban feltüntettük a laboratóriumokon belüli — ismételhetőségre vonatkozó — szórás ( $SD_r$ ) és relatív szórás értékeket ( $RSD_r$ ), valamint a laboratóriumok közötti — összehasonlíthatóságra vonatkozó — szórás ( $SD_R$ ) és relatív szórás értékeket ( $RSD_R$ ). Ezen értékek számolása az alábbiak szerint történt:

$$RSD = \frac{SD}{PA} \cdot 100$$

ahol: RSD = relatív szórás

SD = standard eltérés

PA = foszfatázaktivitás átlagérték

A 2. táblázat adatai szerint az A<sub>1</sub> és B<sub>1</sub> vizsgálati mintának az ismételhetőségre és az összehasonlíthatóságra vonatkoztatott RSD-értékei elfogadhatónak látszanak, a C<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> és E<sub>1</sub> mintáknál azonban a körtesztet célszerűnek láttuk megismételni. Ezért a C, D és E kezelésekkel a körtesztet megismételtük (C<sub>2</sub>, D<sub>2</sub> és E<sub>2</sub> jelű minta), ez esetben is 2 „rejtett” párhuzamost alkalmazva (3x2 minta). Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat: Az 1. táblázat adataiból számított foszfatázaktivitás átlagértékek(PA), valamint az ismételhetőségre és az összehasonlíthatóságra vonatkozó standard eltérések ( $SD_r$  és  $SD_R$ ) és relatív standard eltérések ( $RSD_r$  és  $RSD_R$ )**

Statisztikai jellemzők	Vizsgálati minta							
	A <sub>1</sub> ( $\bar{o}$ )	A <sub>1</sub> (n)	B <sub>1</sub> ( $\bar{o}$ )	B <sub>1</sub> (n)	C <sub>1</sub> ( $\bar{o}$ )*	D <sub>1</sub> ( $\bar{o}$ )	D <sub>1</sub> (n)	E <sub>1</sub> ( $\bar{o}$ )*
Laborok száma	9	6	9	7	9	9	8	9
PA	2002	2118	1301	1288	672	690	665	457
$SD_r$	172	100	202	28	58	82	28	119
$RSD_r$	8,6	4,7	15,5	2,2	8,6	11,9	4,2	26,0
$SD_R$	378	133	280	13	178	186	171	138
$RSD_R$	18,9	6,3	21,5	12,6	26,4	26,9	25,7	30,2

( $\bar{o}$ ) kiugró értékekkel együtt

(n) kiugró értékek nélkül

\* kiugró érték nem volt

**3. táblázat: A második körtesztben mért foszfatázaktivitás értékek**

Minta jele	A laboratóriumok által mért foszfatázaktivitások ( $\mu\text{mol fenol}/1000 \text{ g}$ minta)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C <sub>2</sub>	697	568	604	755	605	633	888	638	615	621
	691	644	657	766	724	471	913	567	724	809
D <sub>2</sub>	567	545	481	649	575	509	779	644	708	764*
	585	513	451	660	588	497	801	590	691	617*
E <sub>2</sub>	320	561*	404	383	435	339	660	417	402*	516
	343	262*	336	340	326	296	562	408	1149*	494

\* kiugró érték ( $p < 0,025$ ; Cochran próba)

A Cochran-féle maximum variancia próbával 3 kiugró értéket találtunk. A Grubbs próba azonban itt nem jelzett kiugró átlagértéket.

A 3. táblázat eredményeinek statisztikai értékelését — kiugró értékekkel, illetve azok nélkül — a 4. táblázatban láthatjuk.

Mint a 4. táblázat is mutatja, a C<sub>2</sub> és D<sub>2</sub> mintáknál az RSD-értékek a C<sub>1</sub> és D<sub>1</sub> mintákkal összehasonlítva, lényeges csökkenést mutattak (lásd 2. táblázat). Az E<sub>1</sub> és E<sub>2</sub> minták RSD<sub>R</sub>-értékei azonban nem mutattak lényeges eltérést.



**4. táblázat: A 3. táblázat adataiból számított foszfatázaktivitás átlagértékek (PA), valamint az ismételhetőségre és az összehasonlíthatóságra vonatkozó standard eltérések ( $SD_r$  és  $SD_R$ ) és relatív standard eltérések ( $RSD_r$  és  $RSD_R$ )**

Statisztikai jellemzők	Vizsgálati minta				
	$C_2$ ( $\bar{o}$ )*	$D_2$ ( $\bar{o}$ )	$D_2$ (n)	$E_2$ ( $\bar{o}$ )	$E_2$ (n)
Laborok száma	10	10	9	10	8
PA	680	611	602	447	411
$SD_r$	71	37	19	184	44
$RSD_r$	10,5	6,1	3,1	41,2	10,7
$SD_R$	111	103	103	195	104
$RSD_R$	16,3	16,9	17,0	43,5	25,3

( $\bar{o}$ ) kiugró értékekkel együtt

(n) kiugró értékek nélkül

\* kiugró érték nem volt

A 2. és 4. táblázatból látható, hogy a relatív szórások (RSD) a klasszikus analitikai eljárások hasonló értékeit ugyan meghaladják, de hangsúlyozni kívánjuk, hogy az ilyen összehasonlítások meglehetősen önkényesek. **A relatív szórás vagy másnéven variációs koefficiens (RSD-érték) nem teremt ugyanis a különböző célra kifejlesztett analitikai eljárások között közös összehasonlítási alapot.** Ennek egyik, de nem kizárólagos oka az RSD-értékek koncentrációfüggése (Püschel, 1968; Horwitz és mtsai., 1990).

Ha eredményeinket Dransfield és munkatársai (1983) nemzetközi körtesztjének adataival hasonlítjuk össze, megállapíthatjuk, hogy — a foszfatázaktivitáshoz hasonlóan — nagynak tűnő  $RSD_R$ -értékek adódtak a zsír- és kollagéntartalom meghatározásánál soványhús mintákban. Ezeket a vizsgálatokat 8 különböző európai laboratóriumban végezték a szokásos rutin módszerekkel (5. táblázat).

**5. táblázat: 8 európai laboratóriummal végzett körteszt eredménye (Dransfield és mtsai., 1983)**

Jellemzők	x	$RSD_r$	$RSD_R$
Víztartalom, %	74,3	0,24	0,45
Zsírtartalom, %	3,8	9,0	13,9
Kollagéntartalom, % (hidroxiprolin módszer)	1,2	4,9	19,4
Nitrogéntartalom, %	3,4	1,8	2,9

Horwitz és munkatársai (1990, 1993) szintén nagyak tűnő  $RSD_R$ -értékekről számolnak be a mikotoxin-tartalom meghatározására irányuló körteszt során.

Egy mérési módszer eredményeinek összehasonlíthatóságára vonatkozó  $RDS_R$  értékek nagysága a módszer „bonyolultságára” is utal. A foszfatázaktivitás meghatározási módszernek több olyan kritikus pontja is van, amelyek miatt az eljárás nem sorolható a „robosztus” módszerek közé. Ezek az alábbiak:

- a minta homogenizálása citrátpufferben Ultra Turrax készülékkel,
- a szuszpenzióból történő egyenletes mintavétel mágneses keverő segítségével,
- a 37 °C-os állandó hőmérséklet biztosítása a vizsgálati mintán belül a reakció során, valamint
- a színkialakítás előírásának pontos betartása.

Az első két pontban említett lépések meghatározó jelentőségűek a módszer megbízhatósága szempontjából. Ennek oka, hogy a hőkezelt húsban a foszfatáz enzim az oldhatatlan, koagulált fehérjerészecskékhez kötődik, azaz a folyamat heterogén katalízisnek tekinthető (Körmendy és Gantner, 1967).

**Nyilvánvaló, hogy a foszfatáz próba megbízhatósága a klasszikus analitikai eljárásokkal összehasonlítva nem értékelhető, hanem azt csak a hőkezelés mértékének ellenőrzésére vonatkoztatva szabad szemlélni.** Ezt a dobozolt sonka és lapocka esetében is a termék geometriai középpontjában vizsgálják és célszerűen ekvivalens pasztőrözési időben (EPI) vagy ekvivalens maximális maghőmérsékletben (EM) adják meg. (Az AOAC-nak nemrégiben tettünk javaslatot e fogalmak bevezetésére a nem egyértelmű maghőmérséklet előírás helyett.) A módosított módszerrel mért foszfatázaktivitás (PA) és az EM között — 10,3x16,9x32,3 cm méretű dobozoknál, 74 °C állandó külső hőfokon, vízben főzve, ahol a sonka kiindulási hőmérséklete  $7\pm 3$  °C) — az alábbi empirikus összefüggést nyertük:

$$EM = 114,91 - 16,03 \cdot \log PA$$

$$SD\{EM\} = 16,03 \cdot SD\{\log PA\}$$

Az ekvivalens maximális maghőmérsékletre (EM) átszámított statisztikai paraméterek eredményeit a 6. táblázat tünteti fel. A táblázat adatait a 2. és 4. táblázatával összehasonlítva látható, hogy a relatív szórások ( $RSD_r$  és  $RSD_R$  értékek) mintegy egy nagyságrenddel csökkentek, ami a fenti egyenlet szerinti logaritmikus transzformáció következménye.

**6. táblázat: Az ekvivalens maximális maghőmérsékletre átszámított átlagok (EM), szórások ( $SD_r$  és  $SD_R$ ) és relatív szórások ( $RSD_r$  és  $RSD_R$ )**

Minta jele	Laborok száma	EM °C	$SD_r$ °C	$RSD_r$	$SD_R$ °C	$RSD_R$
A <sub>1</sub>	6	61,6	0,56	0,91	0,64	1,04
B <sub>1</sub>	7	65,1	0,17	0,26	0,88	1,35
C <sub>1</sub>	9	69,6	0,55	0,80	1,15	1,66
C <sub>2</sub>	10	69,6	0,78	1,12	1,12	1,61
D <sub>1</sub>	8	69,9	0,28	0,40	1,97	2,82
D <sub>2</sub>	9	70,4	0,23	0,32	1,16	1,65
E <sub>1</sub>	9	72,3	1,13	1,56	1,76	2,43
E <sub>2</sub>	8	73,0	0,74	1,01	1,62	2,21

Ha a az  $SD_R^2$  értékéből az  $SD_r^2$  értékét levonjuk, akkor a laboratóriumok közötti standard eltérés átlaga  $SD_L \approx 1,1$  °C. Magától értetődő, hogy az  $SD_L$  hatása a módszer pontosságára — egy adott laboratóriumon belül — a párhuzamos meghatározások számának növelésével nem csökkenthető. (A „laboratóriumok közötti” standard hiba csökkentése csak ugyanazon homogenizált minták több laboratóriumban történő egyidejű vizsgálatával volna lehetséges, ami azonban gyakorlatilag nem járható út.) A 95 %-os szintű tolerancia intervallum ily módon közelítőleg  $\pm 2,2$  °C. Ez az érték elég nagy, de még elfogadható, miután tudomásunk szerint a jelenleginél jobb módszer a dobozott sonkák és dobozott lapockák hőkezelésének ellenőrzésére egyelőre nincs (Cattaneo és Lorenzi, 1994).

## Irodalom

- Amtliche Sammlung 35 LMBG (1983): Planung und statistische Auswertung von Ringversuchen. Statistik, **5**, 1.
- Cattaneo, P., Lorenzi, G. (1994): Attività fosforica acida residua in prosciutti cotti. Ingegneria Alimentare, **5**, 35.
- Cohen, E. H. (1969): Determination of acid phosphatase activity in canned hams as an indicator of temperatures attained during cooking. Food Technol., **23**, 101.
- Collaborative Study Guidelines (1995): J. AOAC International, **78**, 143A.
- Dransfield, E., Casey, J. C., Boccard, R., Touraille, C., Buchter, L., Hood, D. E., Joseph, R. L., Schön, I., Casteels, M., Cosentino, E., Tinbergen, B. J. (1983): Comparison of chemical composition of meat determined at eight laboratories. Meat Sci., **8**, 79.
- Di Pietro, D. L., Zengerle, F. S. (1967): Separation and properties of acid phosphatase from human placenta. J. Biol. Chem., **242**, 3391.

- Finogerova, N. V., Markova, O. V., Mikhailova, L. N., Trusevich, Z. G. (1973): Control methods in heat treatment of meat products. *Gigiena i Sanitariya*, **10**, 106.
- Griffiths, M. W. (1986): Use of milk enzymes as indicators of heat treatment. *J. Food Protec.*, **49**, 696.
- Handbook for AOAC members (1989): AOAC Edition, Arlington, VA, USA.
- Horwitz, W., Albert, R., Deutsch, M. J., Thompson, J. N. (1990): Precision parameters of methods of analysis required for nutrition labeling. Part. I. Major nutrients, *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, **73**, 661.
- Horwitz, W., Albert, R., Nesheim, S. (1993): Reliability of mycotoxin assays — an update. *J. AOAC Intern.*, **76**, 461.
- Igarashi, M., Hollander, V. P. (1968): Acid phosphatase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6084.
- ISO/DIS 5725 (1977): Precision of test methods — Determination of repeatability and reproductibility. Draft International Standard.
- Körmendy L. (1963): A húskészítmények főttségének megállapítására szolgáló eljárások kritikai vizsgálata, különös tekintettel a foszfatázaktivitás meghatározására. Kandidátusi disszertáció, Budapest.
- Körmendy, L., Gantner, Gy. (1967): Neuere Angaben über die saure Phosphomonoesterase des Fleisches. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **134**, 141.
- Körmendy L., Czeglédi-Jankó J., Nagy E. (1988): Körtesztek (kollaboratív tesztek) alkalmazása a vizsgálati módszerek megbízhatóságának megítélésében. *Élelmezési Ipar*, **42**, 336.
- Körmendy, L., Zsarnóczay, G., Mihályi, V. (1992): A new, modified acid phosphatase assay for determining the extent of heat treatment in canned hams. *Food Chem.*, **44**, 367.
- Lawrie, R. A. (1979): *Meat Science*. Pergamon Press, Oxford.
- MSZ 546/1977: Egyenletes eloszlású véletlen számok.
- Püschel, R. (1968): Zur Problem der Genauigkeit chemischer Analysen. *Microchimica Acta* (Wien), **4**, 783.
- Roche Diagnostica (1986): Prostatic phosphatase. 134.
- Tyszkiewicz, S., Krysiak, A. (1976): Value of the acid phosphatase activity test in determining temperature in the centre of preserved products during heat treatment. *Gospodarka Miesna*, **28**, 20.
- USDA Chemistry Laboratory Guidebook (1987): Determination of internal cooking temperature. Secs 3.49 — 3.53.
- USDA—APHIS (1982): Code of federal regulations. Title 9.
- Wernimont, G. T., Spendley, W. (1985): Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. AOAC Edition, Arlington, VA, USA.
- Youden, W. J., Steiner, H. (1975): *Statistical Manual of the AOAC*. AOAC Edition, Arlington, VA, USA.
- Zsarnóczay G., Körmendy L. (1992) Új módszer húskészítmények hőkezelésének ellenőrzésére a foszfatáz próba alapján. *A Hús*, **2**, 135.

# **Foszfátaktivitás meghatározás nemzetközi körtesztjének értékelése**

*Zsarnóczy Gabriella*

A szerző korábbi munkája során szerzőtársaival módosította a hús és húskészítmények hőkezelttségének ellenőrzésére szolgáló foszfátáz próbát. Ebben a cikkben az új módszer ismételtetését és összehasonlíthatóságát vizsgálja az általa szervezett nemzetközi körteszt eredményeinek tükrében.

## **Evaluation of an International Interlaboratory Test on Phosphatase Activity**

*Zsarnóczy, G.*

Phosphatase test for monitoring the heat treatment of meat and meat products was modified by the author in a former study. This paper discusses the repeatability and reproducibility of the new method as reflected by the results of an international interlaboratory test organised by the author.

## **Auswertung eines internationalen Ringtestes über die Phosphataseaktivität**

*Zsarnóczy, G.*

Verfasser hat durch frühere Arbeiten die Phosphataseprobe mit anderen Wissenschaftlern modifiziert, die für die Überprüfung der Hitzebehandlung von Fleisch und Fleischprodukten genutzt wird. In diesem Artikel werden die Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit der neuen Methode auf der Grundlage des durch den Verfasser organisierten internationalen Ringtestes diskutiert.